



<p>(51) 国際特許分類6 C12P 7/64 // (C12P 7/64, C12R 1:645)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/12744</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月9日 (09.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04653</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月27日 (27.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/243583 1998年8月28日 (28.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 秋元健吾(AKIMOTO, Kengo)[JP/JP] 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka, (JP) 東山堅一(HIGASHIYAMA, Kenichi)[JP/JP] 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-602 Osaka, (JP) 清水 昌(SHIMIZU, Sakayu)[JP/JP] 〒616-8212 京都府京都市右京区常盤山下町6-9 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: <u>PROCESS FOR PRODUCING ARACHIDONIC ACID-CONTAINING LIPID AND DIHOMO-<math>\gamma</math>-LINOLENIC ACID-CONTAINING LIPID</u></p> <p>(54)発明の名称 アラキドン酸含有脂質並びにジホモ<math>\gamma</math>-リノレン酸含有脂質の製造方法</p> <p>(57) Abstract A process for producing an arachidonic acid-containing lipid characterized by culturing a mutant having been depressed or inactivated in the activity of <math>\omega</math>3-unsaturation, which is obtained by mutating a microorganism belonging to the genus <i>Mortierella</i>, etc. and being capable of producing arachidonic acid, in a medium at a temperature lower than the optimum temperature thereof, either from the initiation of the culture or after culturing at the optimum temperature for a while, and then taking up the arachidonic acid-containing lipid from the culture medium.</p>		

## (57)要約

モルティエレラ (*Mortierella*) 属などに属しアラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した変異株を、培地中で培養開始から、又は最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養し、その培養物からアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LJ リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア・ビサオ	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

アラキドン酸含有脂質並びにジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有脂質の製造方法

## 発明の分野

本発明は $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失した変異株を用いて醗酵法により、アラキドン酸含有脂質を製造する方法、またはジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有脂質を製造する方法に関する。

## 背景技術

アラキドン酸はドコサヘキサエン酸と同じく母乳中に含まれており、乳児の発育に役立つとの報告（「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, 1993, pp. 261-264）や、胎児の身長や脳の発育における重要性に関する報告（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1073-1077 (1993), Lancet, 344, 1319-1322 (1994)）がなされ、母乳と調製粉乳の脂肪酸組成の大きな違いであるアラキドン酸及びドコサヘキサエン酸を調製粉乳に添加しようとする動きがある。

また早産児の場合のアラキドン酸およびドコサヘキサエン酸の摂取量をそれぞれ60 mg/kg/日および40 mg/kg/日に、成熟児の場合のアラキドン酸およびドコサヘキサエン酸の摂取量をそれぞれ40 mg/kg/日および20 mg/kg/日にするようにとの勧告書もFAO/WHOより出されている。

そこでこれらの脂肪酸を大量に得る方法として、従来から微生物による生産方法が知られており、例えばモルティエラ（Mortierella）属に属する微生物を使用して、安価な常用の培地を用いて、

従来法より短い培養時間で、高収率で、しかも単純な工程でアラキドン酸を製造することができる方法が提供されている（特公平 7-34752）。

しかしながら、このような従来の製造方法では、アラキドン酸の全脂肪酸に占める割合に関しては、未だ満足いくものではない。すなわちアラキドン酸を含有する脂質を食品などに添加する場合、出来る限りアラキドン酸の含有率が高い方が、不必要な物質の添加を最小限に抑えられ、また該脂質の食品への添加量を最小限に抑えられるため、品質的にもコスト的にも好ましく、また該脂質からアラキドン酸エチルエステルを分離精製する場合にも、出来る限りアラキドン酸の含有率が高い方が簡便かつ低コストで高純度品を得ることができるため好ましい。

脂質中のアラキドン酸の全脂肪酸に占める割合を高める方法として、いくつかの方法が知られている。例えば、モルティエレラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）を 28℃ の通常の通気攪拌培養で培養し、グルコースが完全に枯渇した状態で、さらに 6 日間培養を続けることで 67.4% までアラキドン酸の割合を高めることに成功している（Appl. Microbial. Biotechnol., 31, 11-6 (1989)）。しかし、この方法は、飢餓状態の菌が生命を維持するために菌体内のトリグリセリドの飽和度の低い脂肪酸を  $\beta$  酸化しエネルギーに変換することを利用している。

従ってアラキドン酸の総量には変化が無く、低不飽和度の脂肪酸が減少することによって、相対的にアラキドン酸の割合が高まっているに過ぎない。即ち、アラキドン酸を高含有率で含むトリグリセリドの生成量が上昇しているわけではなく、逆に  $\beta$  酸化によりトリグリセリドの割合も低下していると考えられる。

また一般に、アラキドン酸生産能を有する微生物は、最適生育温

度よりも低い温度では、不飽和脂肪酸の不飽和度を高めることで細胞膜の流動性及び機能を維持し低温環境に適応しようとするため、 $\Delta 6$  不飽和化酵素や  $\Delta 5$  不飽和化酵素等の活性が高まり、アラキドン酸のような不飽和度の高い脂肪酸がより多く生成されることが知られている。従ってアラキドン酸の含有率を高めるためには低温で培養することが望ましい。

この性質を利用した方法として、モルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) を  $20^{\circ}\text{C}$  の通気攪拌培養で 16 日間培養し、71.2% までアラキドン酸の割合を高めることに成功している (「Industrial Applications of Single Cell Oils」, American Oil Chemists' Society Champaign, 1992, pp.52-60)。しかし、この方法では培養に時間がかかりすぎて工業生産には好ましくないばかりでなく、低温培養では、せっかく生産されたアラキドン酸の一部が、低温で働く  $\omega 3$  不飽和化酵素 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 150, 335-341 (1988)) によってエイコサペンタエン酸に変換されてしまい、全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が減少し、エイコサペンタエン酸の割合が増加してしまうことが知られている。

例えば、モルティエラ (Mortierella) 属糸状菌を  $12^{\circ}\text{C}$  で 7 週間培養した場合、 $\omega 3$  不飽和化酵素が活性化され、全脂肪酸に対する EPA の割合は 2 - 20% に達し (J. Am. Oil Chem. Soc., 65, 1455-1459 (1988)、それに伴ってアラキドン酸の割合は低下する。これに対し、本発明の  $\omega 3$  不飽和化酵素が低下あるいは欠損した株を用いることにより、アラキドン酸の脂質中の全脂肪酸に対する割合を 50% 以上、さらに変異を繰り返した場合には 70% 以上にも高めることができ、かつ EPA の割合を 0.5% 以下に押さえることができる。

本来、母乳中にはエイコサペンタエン酸はほとんど含まれておら

ず、最近の研究では未熟児の発育には不都合であることが明かとなった（「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, 1993, pp.261-264）。したがって、エイコサペンタエン酸を全く含まない、あるいは含んでもごくわずかな、アラキドン酸の含有率の高い脂質を安価な常用の培地を用いて単純な工程で大量に製造する方法を開発することが強く望まれている。

一方、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸は、培養温度に関係なく $\Delta 5$ 不飽和化酵素によってアラキドン酸に変換されるが、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を醗酵法により安価に大量生産する方法として、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の活性を阻害するような物質、例えばセサミン、エピセサミン、セサミノール、エピセサミノール等やクルクミン等を培地に添加して培養することや、アラキドン酸生産能を有する微生物に突然変異を誘発させ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠損した変異株を用いて培養することが知られている（特開平1-243992、特開平3-72892、特開平3-49688、特開平5-91887号公報）。

しかしながら、この場合もジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の含有率を高めようと最適生育温度よりも低い温度、例えば12℃で培養すると上述の $\omega 3$ 不飽和化酵素が作用し、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の一部が8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸に変換されてしまうため、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の割合が減少し、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸の割合が増加してしまうことが懸念される。したがって、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の含有率の高い脂質を安価な常用の培地を用いて単純な工程で大量に製造する方法を開発することが強く望まれている。

## 発明の開示

従って本発明は、アラキドン酸の含有率が高く、エイコサペンタエン酸を全く含まないあるいは含んでもごくわずかな、アラキドン酸含有脂質を安価な常用の培地を用いて単純な工程で大量に製造する方法、並びにエイコサペンタエン酸や8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸を全く含まない、あるいは含んでもごくわずかな、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の含有率の高い脂質を安価な常用の培地を用いて単純な工程で大量に製造する方法を提供しようとするものである。

本発明者等は、上記の目的を達成するため、種々研究の結果、アラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失した微生物を見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属またはサプロレグニア (Saprolegnia) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失した微生物を、培地中で培養開始から、又は最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養し、その培養物からアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法を提供するものである。

さらに本発明は、モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する

微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した微生物を、培地中で培養開始時より又は 20～40℃で培養した後に、20℃より低い温度で培養し、その培養物からアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法を提供するものである。

また本発明は、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属またはサプロレグニア (Saprolegnia) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる  $\Delta$ 5 不飽和化活性の低下または欠失した微生物に、変異処理を施して得られる  $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した微生物を、培地中で培養開始時より又は最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養し、その培養物からジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供するものである。

さらに本発明は、モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物に変異処理を施して得られる  $\Delta$ 5 不飽和化活性の低下または欠失した微生物に、変異処理を施して得られる  $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した微生物を、培地中で培養開始時より又は 20～40℃で培養した後に、20℃より低い温度で培養し、その培養物からジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供す



るものである。

#### 発明の実施の形態

本発明において、変異処理を施す微生物として、 $\Delta 6$  不飽和化酵素及び $\Delta 5$  不飽和化酵素を有し、脂肪酸生合成経路中でアラキドン酸まで生産することができるモルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クロドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinozporangium) 属およびサプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物を、より好ましくはモルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinozporangium) 属及びサプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物を挙げることができる。

より具体的にはフィチウム (Pythium) 属に属する微生物として例えばフィチウム・インシジオスム (Pythium insidiosum) A T C C 2 8 2 5 1 を、またエキノスポランジウム (Echinozporangium) 属に属する微生物として例えばエキノスポランジウム・トランスバーサリス (Echinozporangium transversalis) A T C C 1 6 9 6 0 (N R R L 3 1 1 6) および A T C C 1 8 0 3 6 (N R R L 5 5 2 5) を、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物として例えばサプロレグニア・フェラクス (Saprolegnia ferax) C B S 5 3 4 . 6 7、サプロレグニア・ラッポニカ (Saprolegnia lappon

ica) CBS 284.38、サプロレグニア・リトラリス (Saprolegnia litoralis) CBS 535.67、サプロレグニア・モニリゲラ (Saprolegnia moniligera) CBS 558.67 およびサプロレグニア・ツルフォサ (Saprolegnia turfosa) CBS 313.82等の菌株を挙げることができる。

特に本発明ではアラキドン酸の生産能力が高いモルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物が好ましい。本発明のモルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物としては、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina)、モルティエレラ・パルビスポラ (Mortierella parvispora)、モルティエレラ・ベルジャコバ (Mortierella beljakovae)、モルティエレラ・グロバルピナ (Mortierella globalpina)、モルティエレラ・エピガマ (Mortierella epigama)、モルティエレラ・クフルマニ (Mortierella kuhlmanii)、モルティエレラ・アクトトナ (Mortierella acrotona)、モルティエレラ・ザイチャ (Mortierella zychae)、モルティエレラ・リシケシャ (Mortierella rishiksha)、モルティエレラ・ミヌチシマ (Mortierella minutissima)、モルティエレラ・バイニエリ (Mortierella bainieri)、モルティエレラ・シュマッカーリ (Mortierella schmuckeri)等を挙げることができる。

具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IFO 8571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO 5941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IFO 10311、モルティエレラ・パルビスポラ (Mortierella parvispora) IFO 10312、モルティエレラ・ベルジャコバ (Mortierella beljakovae) IFO 10313、モルティエレラ・グロバルピナ (Mortierella globalpina) IFO 10314、モルティエレラ・エピガマ (Mortierella epigama) IFO 10315、モルティエレラ・クフルマニ (Mortierella kuhlmanii) IFO 10316、モルティエレラ・アクトトナ (Mortierella acrotona) IFO 10317、モルティエレラ・ザイチャ (Mortierella zychae) IFO 10318、モルティエレラ・リシケシャ (Mortierella rishiksha) IFO 10319、モルティエレラ・ミヌチシマ (Mortierella minutissima) IFO 10320、モルティエレラ・バイニエリ (Mortierella bainieri) IFO 10321、モルティエレラ・シュマッカーリ (Mortierella schmuckeri) IFO 10322等を挙げることができる。

Mortierella alpina) I F O 8 5 6 8、A T C C 1 6 2 6 6、A T C C 3 2 2 2 1、A T C C 4 2 4 3 0、C B S 2 1 9. 3 5、C B S 2 2 4. 3 7、C B S 2 5 0. 5 3、C B S 3 4 3. 6 6、C B S 5 2 7. 7 2、C B S 5 2 9. 7 2、C B S 6 0 8. 7 0、C B S 7 5 4. 6 8等の菌株を挙げることができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醸酵研究所（I F O）、及び米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection, A T C C）及び、Centrralbureau voor Schimmelcultures（C B S）からなんら制限なく入手することができる。また我々研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ S A M 0 2 1 9（微工研菌寄第 8 7 0 3 号）（微工研条寄第 1 2 3 9 号）を使用することもできる。

また本発明において変異処理を施す微生物としては、上記の微生物の野生株に限らず上記の微生物（野生株）、好ましくはモルティエラ（Mortierella）属モルティエラ（Mortierella）亜属に属する微生物（野生株）の変異株又は組換え株、即ち、同じ基質を用いて培養したときに、元の野生株が産生する量と比べて、脂質中のアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の含量が多くなるように、または総脂質量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。

さらに費用効果の優れた基質を効率よく用いて、対応する野生株と同量の不飽和脂肪酸を産生するように設計された微生物も含まれる。例えば  $\Delta 12$  不飽和化活性が欠失しかつ  $\Delta 6$  不飽和化活性が上昇した変異株としてモルティエラ・アルピナ S A M 2 0 8 6（微工研条寄第 6 0 3 2 号、F E R M B P - 6 0 3 2）や、人為的にジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の生産性を増加させるために誘発した  $\Delta 5$  不飽和化活性が欠失した変異株としてモルティエラ・アルピナ S

AM1860 (微工研条寄第3589号、FERM BP-3589) を挙げることができる。

また本発明において、本発明の $\omega$ 3不飽和化活性が低下した変異株に変異処理を施し、 $\omega$ 3不飽和化活性がさらに低下したあるいは欠失した変異株を得ることもできる。

本発明において $\omega$ 3不飽和化活性とは、脂肪酸のメチル基から数えて第3番目と第4番目の炭素の間に二重結合を入れる作用を言うものであり、 $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失した微生物は、容易にその $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失を判定することができる。

具体的には、アラキドン酸含有脂質の製造においては、親株を変異処理して得られた変異株を最適生育温度よりも低い温度、たとえば20℃よりも低い温度で培養した際の菌体内のエイコサペンタエン酸の全脂肪酸に占める割合で判定することができる。つまり低温培養下での親株と変異株のエイコサペンタエン酸の割合を比較した場合に親株のエイコサペンタエン酸の割合を1として、変異株のエイコサペンタエン酸の割合が1以下の時、活性が低下していると言え、0の時、活性が欠失していると言える。

またジホモ $\gamma$ -リノレン酸含有脂質の製造においては、親株（例えば $\Delta$ 5不飽和化活性の低下または欠失した変異株）を変異処理して得られた変異株を最適生育温度よりも低い温度、たとえば20℃よりも低い温度で培養した際の菌体内の8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸の全脂肪酸に占める割合で判定することができる。つまり低温培養下での親株と変異株の比較において親株の8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸の割合を1として、変異株が1以下の時、活性が低下し、0の時、活性欠失していると言える。

本発明のジホモ-γ-リノレン酸の製造方法において使用する微生物としては、アラキドン酸生産能を有する微生物を変異処理して得られる、 $\omega 3$ 不飽和化活性が低下または欠失した変異株を使用することができるが、さらに $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下または欠失した変異株を用いるのが好ましい。 $\omega 3$ 不飽和化活性が低下又は欠失し、且つ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下または欠失した変異株を得るには、本発明において得られる $\omega 3$ 不飽和化活性が低下又は欠失した変異株をさらに変異処理して、 $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失した変異株を選択することができる。あるいは、すでに $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失している株を変異処理して、さらに $\omega 3$ 不飽和化活性が低下又は欠失させることによって得られる。

本発明において変異処理は、放射線（X線、ガンマー線、中性子線、重イオン）照射や紫外線照射、高熱処理等を行って突然変異を誘発させたり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異原を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった一般的な突然変異操作により行うことができる。

変異原としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート（MMS）、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）等のアルキル化剤や、5-ブロモウラシル等の塩基類似体や、マイトマイシンC等の抗生物質や、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤や、プロフラビン等の色素類（その他の誘導体）や、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発がん剤や塩化マンガン、ホルムアルデヒド等のその他の化合物を挙げることができる。また使用する微生物は、生育菌体（菌糸など）でも良いし、胞子でも良い。

例えば本発明の変異株として、アラキドン酸生産能を有するモル

ティエレラ・アルピナ I F O 8 5 6 8 から本発明者らが誘導した ω 3 不飽和化活性が限りなく低下したモルティエレラ・アルピナ S A M 2 1 5 3 ( F E R M P - 1 5 7 6 7 ) ( F E R M B P - 6 7 9 4 ) を使用することができるが、この菌株に限定しているわけではなく、低温培養下での親株のエイコサペンタエン酸の割合を 1 とし、1 以下の活性を示す変異株をすべて使用することができる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。脂肪酸又はそれを含有する脂質の工業的大量生産のためには、液体培地を用いるのが好ましい。

この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は 0. 1 ~ 4 0 重量%、好ましくは 1 ~ 2 5 重量%、窒素源は 0. 0 1 ~ 1 0 重量%、好ましくは 0. 1 ~ 1 0 重量%の濃度とするのが望ましく、より好ましくは初発の炭素源添加量を 1 ~ 5 重量%、初発の窒素源添加量を 0. 1 ~ 6 重量%として、培養途中で炭素源及び窒素源を、さらに、より好ましくは、炭素源のみを流加して培養する。

本発明の変異株は、培地中で培養開始から菌の最適生育温度より低い温度で培養するか、あるいは最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養する。ここで最適生育温度とは使用する微生物によって異なるが、20～40℃、好ましくは20～30℃であり、最適生育温度より低い温度とは25℃より低い温度、好ましくは20℃より低い温度、さらに好ましくは20℃より低く5℃以上の温度である。このような温度管理により、菌体内への油脂の蓄積を上昇せしめることができる。

培養期間は、培養開始時から最適生育温度より低い温度で培養する場合には、2～20日間、好ましくは2～14日間行う。また最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養する場合には、最適生育温度で1～6日間、好ましくは1～4日間行い、最適生育温度より低い温度で2～14日間、好ましくは2～10日間行う。

培地のpHは4～10、好ましくは6～9として、通気攪拌培養、振盪培養又は静置培養を行う。

固体培養で培養する場合は、固形物重量に対して50～100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、前記の温度において、3～14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

また本発明においては、培地中にアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の生合成基質を添加して培養することにより、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の蓄積を促進することもできる。生合成基質としてはテトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の脂肪酸又はその塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）又はエステル、あるいは脂肪酸が構成成分として含まれる油脂（例えば、

オリーブ油、ヤシ油、パーム油)等を挙げることができる。

特に脂肪酸の中でもアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の前駆体であるオメガ6系不飽和脂肪酸を添加して培養することにより、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の蓄積をより効果的に行うことができる。該オメガ6系不飽和脂肪酸としては例えばリノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を挙げることができ、該脂肪酸を構成成分として含有する油脂としては例えばサフラワー油、大豆油、トウモロコシ油、綿実油、Bio- $\gamma$  ( $\gamma$ -リノレン酸含有トリグリセリド)等を挙げることができる。

基質の総添加量は培地に対して0.001~10重量%、好ましくは0.5~10重量%である。これらの基質は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは連続的に添加することもできる。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

このようにして培養して、菌体内にアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を大量に含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、例えば、次のようにしてアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の採取を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール



- 水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質が得られる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、各種脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えば $\gamma$ -リノレン酸メチル、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸メチル、アラキドン酸メチル等として分離するのが好ましい。

このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸等（これらも、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸 5～10%、BF<sub>3</sub>-メタノール 10～50%等により、室温にて 1～24 時間処理するのが好ましい。

前記の処理液からアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸のメチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物には、目的とするアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン

酸のメチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等の脂肪酸メチルエステルが含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸のメチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々交流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離されたアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸のメチルエステルからアラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

又、アラキドン酸又はジホモ- $\gamma$ -リノレン酸をそのメチルエステルを経ないで得るには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば 5 % 水酸化ナトリウムにより室温にて 2 ~ 3 時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

## 実施例

### 実施例 1.

モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) I F O 8 5 6 8 を、C z a p e k 寒天培地 (0. 2 % N a N O<sub>3</sub>、0. 1 % K<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub>、0. 0 5 % M g S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O、0. 0 5 % K C l、0. 0 0 1 % F e S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O、3 % シュークロース、2 % 寒天、p H 6. 0) 3 0 0 m l を含む大型スラント瓶に植菌し、2 週間、2 8 °C で培養した。培養後、大型スラント瓶に T w e e n 8 0 を 2 滴加えた滅菌水 5 0 m l を加えてよく振り、4 重のガーゼで濾

過した。この操作を2回繰り返して、濾液を8000xgで10分間遠心した。このようにして得られた胞子を50mM Tris/maleate緩衝溶液(pH 7.5)で $1 \times 10^8$ /mlになるように懸濁し、胞子溶液を調製した。

得られた胞子溶液1.0mlに、100mM Tris/maleate緩衝溶液(pH 7.5)0.5mlを加え、NTG溶液(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン5mg/脱イオン水1ml)500 $\mu$ lを加えて、28℃で15分間インキュベートして変異処理を施した。10%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を3ml加えて、反応液を5500xgで10分間遠心し、沈殿物(変異処理が施された胞子)を滅菌水3mlで洗浄し、5500xgで10分間遠心後、沈殿物に滅菌水2mlを加えてNTG処理された胞子懸濁液とした。

NTG処理された胞子懸濁液は、 $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ 程度に希釈し、GY寒天プレート(1%グルコース、0.5%酵母エキス、0.005%トリトン(Triton)X-100、1.5%寒天、pH 6.0)に塗布した。28℃で培養し、コロニーが出現したものからランダムに新しいプレートにピックアップし、28℃で生育が見られるまで培養した。生育が見られた時点でそのまま低温で保存した。

ピックアップした保存コロニーを、GY寒天プレートで28℃で2日間、12℃で2日間培養し、寒天ごとくりぬいて100℃で乾燥させた。得られた乾燥菌体をねじ口試験管(16.5mm $\phi$ )に入れ、塩化メチレン1ml、無水メタノール-塩酸(10%)2mlを加え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml、水1mlを加えて、2回抽出し、抽出液の溶媒を遠心エバポレーター(40℃、1時間)で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィ

ーで分析した。そして、スクリーニングの結果、低温培養下でエイコサペンタエン酸を生産しないモルティエセラ・アルピナSAM2153 (FERM P-15767) (FERM BP-6794) が得られた。

#### 実施例 2.

GY寒天プレート (1% グルコース、0.5% 酵母エキス、0.005% トリトン (Triton) X-100、1.5% 寒天、pH 6.0) にモルティエセラ・アルピナ (Mortierella alpina) IFO 8568 および実施例 1 で得たモルティエセラ・アルピナSAM2153 (FERM P-15767) (FERM BP-6794) を植菌し静置培養した。培養温度は下記の 6 条件で行った。

1. 28℃ (2 日間)、12℃ (2 日間)
2. 28℃ (4 日間)
3. 12℃ (6 日間)
4. 28℃ (4 日間)、12℃ (3 日間)
5. 28℃ (7 日間)
6. 12℃ (7 日間)

培養終了後、実施例 1 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。表 1 にその結果を示す。

表 1 モルティエセラ・アルピナIFO 8568とSAM 2153の脂肪酸組成の比較

培養条件・日数		菌株		脂 肪 酸 組 成 (%)									
28℃		12℃		16:0	18:0	18:1 $\omega$ 9	18:2 $\omega$ 6	18:3 $\omega$ 6	DGLA	Ara	EPA	24:0	その他
2	2	IFO 8568		16.67	11.79	19.34	5.98	3.71	4.60	25.61	1.11	2.90	8.29
2	2	SAM 2153		15.30	12.89	16.17	6.52	4.91	5.61	28.97	0	2.85	6.78
4	0	IFO 8568		16.04	12.28	15.78	6.76	3.89	3.56	29.66	0	3.38	8.65
4	0	SAM 2153		18.63	12.27	17.19	8.37	4.36	4.49	24.59	0	3.25	6.85
0	6	IFO 8568		12.77	11.27	13.14	5.43	4.50	6.43	33.89	3.02	2.09	7.46
0	6	SAM 2153		12.65	12.31	11.61	5.90	4.84	7.08	37.02	0	1.89	6.70
4	3	IFO 8568		12.36	8.06	14.63	6.78	4.76	4.20	39.58	0	3.27	6.36
4	3	SAM 2153		11.57	7.98	11.12	6.55	4.76	5.47	43.01	0	2.99	6.55
7	0	IFO 8568		10.85	7.43	11.99	7.02	4.66	4.18	42.46	0	4.64	6.77
7	0	SAM 2153		12.96	8.64	13.06	8.47	4.47	4.12	39.36	0	3.30	5.62
0	7	IFO 8568		12.48	8.16	14.94	6.43	5.10	7.82	37.18	3.31	0.57	4.01
0	7	SAM 2153		10.42	9.66	8.63	5.62	4.64	7.08	47.28	0	1.65	5.02

16:0, パルミチン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1 $\omega$ 9, オレイン酸; 18:2 $\omega$ 6, リノール酸; 18:3 $\omega$ 6,  $\gamma$ -リノレン酸;DGLA, ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸; Ara, アラキドン酸; EPA, エイコサペンタエン酸; 24:0, テトラコサン酸

親株である I F O 8 5 6 8 は 1 2 °C で培養した場合、エイコサペンタエン酸を産生し、その割合も 1 2 °C での培養時間に比例して増加しているが、変異株であるモルティエレラ・アルピナ S A M 2 1 5 3 ( F E R M P - 1 5 7 6 7 ) ( F E R M B P - 6 7 9 4 ) は 1 2 °C で長時間培養してもエイコサペンタエン酸を全く産生せず、 $\omega$  3 不飽和化酵素 ( アラキドン酸からエイコサペンタエン酸に変換する酵素 ) 活性が欠失あるいは限りなく低下した変異株であることが明らかとなった。またアラキドン酸からエイコサペンタエン酸への変換能がないことから、低温下では本来エイコサペンタエン酸に変換されるべき分がアラキドン酸として蓄積されるため、低温培養で効率的にアラキドン酸の含有率を高めることが明らかとなった。

### 実施例 3 .

グルコース 4 % および酵母エキス 1 % を含む培地 ( p H 6 . 0 ) 2 m l を 1 0 m l のエルレンマイヤーフラスコに入れ、1 2 0 °C で 2 0 分間殺菌した。モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpi na) I F O 8 5 6 8 および実施例 1 で得たモルティエレラ・アルピナ S A M 2 1 5 3 ( F E R M P - 1 5 7 6 7 ) ( F E R M B P - 6 7 9 4 ) を培地に一白金耳接種し、レシプロシェーカー ( 1 5 0 r p m ) により、1 2 °C で 7 日間、あるいは 1 2 °C で 1 0 日間培養した。表 2 にその結果を示す。1 2 °C で培養を行ってもエイコサペンタエン酸を全く産生せず、アラキドン酸の含有率並びに生産量を高めることが、液体培養でも確かめられた。

表 2 モルティエラ・アルピナ-IFO 8568 と SAM 2153 の脂肪酸組成及びアラキドン酸生産量の比較

培養条件 温度 日数	菌株	成育度 (g/l)	Ara 生産量 (g/l)	脂 肪 酸 組 成 (%)									
				16:0	18:0	18:1 $\omega$ 9	18:2 $\omega$ 6	18:3 $\omega$ 6	DGLA	Ara	EPA	24:0	その他
12℃ 7日	IFO 8568	9.48	0.28	12.92	8.14	19.17	7.79	6.75	6.84	28.21	3.41	1.02	5.75
	SAM 2153	10.52	0.48	11.47	11.65	12.30	6.14	6.93	9.58	36.12	0	1.65	4.16
12℃ 10日	IFO 8568	11.50	0.72	13.42	7.98	19.80	5.78	5.57	7.17	30.73	3.50	1.12	4.93
	SAM 2153	12.88	1.41	8.71	11.85	7.75	3.95	5.79	8.51	48.22	0	2.03	3.19

16:0, パルミチン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1 $\omega$ 9, オレイン酸; 18:2 $\omega$ 6, リノール酸; 18:3 $\omega$ 6,  $\gamma$ -リノレン酸;

DGLA, ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸; Ara, アラキドン酸; EPA, エイコサペンタエン酸; 24:0, テトラコサン酸

実施例 4.

グルコース 4 % および酵母エキス 1 % を含む培地 (pH 6.0) 2 ml に表 3 に示したアラキドン酸の生合成基質又はそれを含有する油脂をそれぞれ 0.5 % 添加し、10 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。実施例 1 で得たモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM 2153 (FERM P-15767) (FERM BP-6794) を培地に一白金耳接種し、レシプロシェーカー (150 rpm) により、12℃で10日間培養した。表 3 にその結果を示す。

表 3

添 加 物	ア ラ キ ド ン 酸		
	含有率 (%)	生 産 量	
		(g/l)	(mg/g)
無 添 加	48.22	1.41	109.2
オクタデカン	49.23	1.46	111.2
オレイン酸ナトリウム	50.10	1.56	119.3
リノール酸ナトリウム	51.30	1.63	124.3
リノレン酸ナトリウム	52.71	1.65	123.5
オレイン酸メチル	52.92	1.68	127.1
リノール酸メチル	53.20	1.73	128.4
リノレン酸メチル	53.25	1.74	128.6
大 豆 油	54.06	1.81	129.0
トウモロコシ油	53.76	1.81	131.4
綿 実 油	54.88	1.84	130.9
サフラワー油	56.64	2.05	143.7

実施例 5.



グルコース 2 %、大豆タンパク 1.5 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 %、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05 %、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1 % および大豆油 0.1 % を含む培地 (pH 6.0) 5 L を 10 L ジャーファーメンターに入れ、120 °C で 30 分間殺菌した。実施例 1 で得たモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM 2153 (FERM P-15767) (FERM BP-6794) を接種し、通気量 1 vvm、10 日間の通気攪拌培養を行った。培養温度は、培養開始時は 20 °C で培養 3 日目より 12 °C に下げて行った。なお培養 1 日目のみ 1 % のグルコースを添加した。

培養 2 日目より培養液 12 ml のサンプリングを行い、実施例 1 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。図 1 a, b, c, d にそれぞれアラキドン酸の生産量 (g/l)、全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合 (%)、生育度 (g/l)、培地中のグルコース濃度 (%) の変化を示す。10 L ジャーファーメンターでの低温条件下での培養が確かめられ、培養 10 日目にはアラキドン酸の全脂肪酸に対する割合が実に 56.4 % に達した。また培養 10 日目の菌体内脂質の脂質画分を分析した結果、トリアシルグリセロールが 85.8 %、遊離脂肪酸が 2.1 %、ジアシルグリセロールが 0.5 %、フォスファチジルエタノールアミンが 3.8 %、フォスファチジルコリンが 3.9 %、フォスファチジルセリンが 2.0 %、フォスファチジン酸が 1.9 % であった。

#### 実施例 6.

グルコース 2 %、大豆タンパク 1.5 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 %、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05 %、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 %、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1 % および大豆油を 0.1 % 含む培地 (pH 6.0) 5 L を 10 L ジャーファーメンターに入れ、120 °C で 3

0 分間殺菌した。そして、実施例 1 と同様にモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) I F O 8 5 6 8 を親株として、再度変異処理を施し、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) の 3 不飽和化酵素低下株 S A M 2 2 3 9 を取得した。

そして、この S A M 2 2 3 9 を植菌し、通気量 1 vvm、12 日間の通気攪拌培養を行った。培養温度は、培養開始時は 24℃ で培養 3 日目より 12℃ に下げて行った。なお、培養 1, 2, 3 日目の 1% のグルコースを添加した。培養最終日の 12 日目にサンプリングを行い、実施例 1 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合は 75.1% に達し、生産量は 4.1 g/L であった。

特許協力条約第 13 規則の 2 の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名 称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 - 3

微生物(1) 表 示：Mortierella elongata SAM0219

寄託番号：FERM BP-1239

寄託日：1986 年 3 月 19 日

(2) 表 示：Mortierella alpina SAM2153

寄託番号：FERM BP-6794

寄託日：1996 年 8 月 5 日

## 請 求 の 範 囲

1. モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属またはサブプロレグニア (Saprolegnia) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した変異株を、培地中で培養開始から、又は最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養し、その培養物からアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

2. 上記変異株を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該変異株が培養されている培養液に炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加してさらに培養することを特徴とする請求項1記載のアラキドン酸含有脂質の製造方法。

3. モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3 不飽和化活性の低下または欠失した変異株を、培地中で培養開始から、又は20～40℃で培養した後に、20℃より低い温度で培養し、その培養物からアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

4. 上記変異株を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該変異株が培養されている培養液に炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加してさらに培養することを特徴とする請求項3記載のアラキドン酸含有脂質の製造方法。

5. モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる $\omega$ 3不飽和化活性の低下または欠失した変異株を、培地中で培養開始から、又は最適生育温度で培養した後に、最適生育温度より低い温度で培養し、その培養物からジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有脂質の製造方法。

6. 前記変異株が、さらに $\Delta$ 5不飽和化活性の低下又は欠失した変異株である、請求項5記載のジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有脂質の製造方法。

7. 上記変異株を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該変異株が培養されている培養液に炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加してさらに培養することを特徴とする請求項5又は6記

載のジホモ-γ-リノレン酸含有脂質の製造方法。

8. モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物に変異処理を施して得られるω3不飽和化活性の低下または欠失した変異株を、培地中で培養開始から、又は20～40℃で培養した後に、20℃より低い温度で培養し、その培養物からジホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ-γ-リノレン酸含有脂質の製造方法。

9. 前記変異株が、さらにΔ5不飽和化活性の低下又は欠失した変異株である、請求項8記載のジホモ-γ-リノレン酸含有脂質の製造方法。

10. 上記変異株を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該変異株が培養されている培養液に炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加してさらに培養することを特徴とする請求項8又は9記載のジホモ-γ-リノレン酸含有脂質の製造方法。

11. アラキドン酸を脂質中の全脂肪酸に対して72重量%以上含有するアラキドン酸含有微生物脂質。

12. エイコサペンタエン酸の脂質中の全脂肪酸に対する割合が0.5重量%以下である請求項11記載のアラキドン酸含有微生物脂質。

13. モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、

エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属し、アラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 $\omega$ 3 不飽和化活性が低下または欠失した微生物。

14. 変異処理を施すアラキドン酸生産能を有する微生物が、モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物である、請求項13記載の $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物。

15. 変異処理を施すアラキドン酸生産能を有する微生物が、モルティエレラ・アルピナである、請求項14記載の $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物。

16. 前記 $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物が、モルティエレラ・アルピナ SAM 2 1 5 3 (FERM BP-6 7 9 4) である請求項15記載の $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物。

17. 請求項13～16のいずれか1項記載の $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物を培養して得られる、脂質中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含量が50重量%以上であるアラキドン酸含有脂質。

18. 請求項13～16のいずれか1項記載の $\omega$ 3 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物を培養して得られる、脂質中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含量が50重量%以上であり、かつエイコサペンタエン酸の含量が0.5重量%以下であるアラキドン酸含有脂質。

19. 脂質中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含量が60重量%以上である請求項17又は18記載のアラキドン酸含有脂質。

20. 脂質中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含量が70重量

%以上である請求項 17 又は 18 記載のアラキドン酸含有脂質。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04653

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12P 7/64 // (C12P 7/64, C12R 1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12P 7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>A</u>	LI, ZU-YI. et al. "Process for production of arachidonic acid concentrate by a strain of Mortierella alpina", Can. J. Chem. Eng. (1995), Vol. 73, No. 1, pages 135-139	<u>11-12, 17-20</u> <u>1-10, 13-16</u>
<u>X</u> <u>A</u>	JP, 2-142486, A1 (LION CORPORATION), 31 May, 1990 (31.05.90) (Family: none)	<u>11-12, 17-20</u> <u>1-10, 13-16</u>
<u>X</u> <u>A</u>	TOTANI, N. et al. "Industrial production of arachidonic acid by Mortierella", Ind. Appl. Single Cell Oils (KYLE, D. J. edit. AOCS Champaign) (1992), pages 52-60	<u>11-12, 17-20</u> <u>1-10, 13-16</u>
<u>X</u> <u>A</u>	WO, 96/21037, A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.), 11 July, 1996 (11.07.96) & AU, 9648542, A & US, 5658767, A & EP, 800584, A1 & NO, 9703085, A & FI, 9702829, A & BR, 9607179, A & MX, 9705078, A1 & JP, 10-512444, W & KR, 98701036, A	<u>17-19</u> <u>1-16, 20</u>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 November, 1999 (30.11.99)Date of mailing of the international search report  
07 December, 1999 (07.12.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04653

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>P, X</u> P, A	WO, 98/39468, A1 (SUNTORY LIMITED), 11 September, 1998 (11.09.98)	<u>17-18</u> 1-16, 19-20
<u>P, X</u> P, A	SHIMADA, Y. et al. "Enzymatic enrichment of arachidonic acid from Mortierella single-cell oil", J. Am. Oil Chem. Soc. (September, 1998), Vol. 75, No. 9, pages 1213-1217	<u>11-12, 17-20</u> 1-10, 13-16
<u>Y</u> A	SHIMADA, Y. et al. "Enrichment of arachidonic acid: Selective hydrolysis of a single-cell oil from Mortierella With Candida cylindracea lipase", J. Am. Oil Chem. Soc. (1995), Vol. 72, No. 11, pages 1323-1327	<u>11-12, 17-20</u> 1-10, 13-16
A	LINDBERG, A. M. et al. "Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus Mortierella alpina CBS 343.66 in fermenter cultures", Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993), Vol. 39, No. 4-5, pages 450-455	1-20
A	JP, 8-214893 (OMEGATECH INC.), 27 August, 1996 (27.08.96), & EP, 726321, A2 & AU, 9537991, A & CA, 2163278, A & US, 5583019, A & US, 5882703, A	1-20

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12P 7/64 // (C12P 7/64, C12R 1:645)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12P 7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	LI, ZU-YI. et al. "Process for production of arachidonic acid concentrate by a strain of <i>Mortierella alpina</i> ", Can. J. Chem. Eng. (1995) Vol. 73, No. 1, p. 135-139	11-12, 17-20 1-10, 13-16
X A	JP, 2-142486, A1 (ライオン株式会社) 31.5月.1990 (31.05.90) (ファミリーなし)	11-12, 17-20 1-10, 13-16
X A	TOTANI, N. et al. "Industrial production of arachidonic acid by <i>Mortierella</i> ", Ind. Appl. Single Cell Oils (KYLE, D. J. edit. AOCs Champaign) (1992), p. 52-60	11-12, 17-20 1-10, 13-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 96/21037, A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.) 11. 7月. 1996 (11. 07. 96) & AU, 9648542, A & US, 5658767, A & EP, 800584, A1 & NO, 9703085, A & FI, 9702829, A & BR, 9607179, A & MX, 9705078, A1 & JP, 10-512444, W & KR, 98701036, A	17-19 1-16, 20
P, X P, A	WO, 98/39468, A1 (サントリー株式会社) 11. 9月. 1998 (11. 09. 98)	17-18 1-16, 19-20
P, X P, A	SHIMADA, Y. et al. "Enzymatic enrichment of arachidonic acid from Mortierella single-cell oil", J. Am. Oil Chem. Soc. (1998. Sep.) Vol. 75, No. 9, p. 1213-1217	11-12, 17-20 1-10, 13-16
Y A	SHIMADA, Y. et al. "Enrichment of arachidonic acid: selective hydrolysis of a single-cell oil from Mortierella with Candida cylindracea lipase", J. Am. Oil Chem. Soc. (1995) Vol. 72, No. 11, p. 1323-1327	11-12, 17-20 1-10, 13-16
A	LINDBERG, A. M. et al. "Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus Mortierella alpina CBS 343. 66 in fermenter cultures", Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) Vol. 39, No. 4-5, p. 450-455	1-20
A	JP, 8-214893 (OMEGATECH INC.) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A2 & AU, 9537991, A & CA, 2163278, A & US, 5583019, A & US, 5882703, A	1-20

09/530260  
ST

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 15 DEC 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 ZE-718	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04635	国際出願日 (日.月.年) 27.08.99	優先日 (日.月.年) 27.08.98
国際特許分類(IPC) Int. C1' G03G 9/08		
出願人(氏名又は名称) 日本ゼオン株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.02.00	国際予備審査報告を作成した日 21.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)	2H 9312
	浅野 美奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3231	

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |   |       |        |                      |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-19

請求の範囲

有

無

進歩性(IS)

請求の範囲

請求の範囲 1-19

有

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

請求の範囲

1-19

有

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

1. JP, 5-188637, A (日本ゼオン株式会社), 30.7月.1993(30.07.93) (国際調査報告で引用された文献)

2. JP, 8-314188, A (三田工業株式会社), 29.11月.1996(29.11.96)

3. JP, 9-90671, A (保土谷化学工業株式会社), 4.4月.1997(04.04.96)

4. JP, 10-177278, A (日本ゼオン株式会社), 30.6月.1998(30.06.98)

5. JP, 9-68862, A (三田工業株式会社), 11.3月.1997(11.03.97) (国際調査報告で引用された文献)

6. JP, 9-292739, A (株式会社巴川製紙所), 11.11月.1997(11.11.97)

7. JP, 8-179603, A (セイコーエプソン株式会社), 12.7月.1996(12.07.96)

請求の範囲1-5, 11, 13, 14

上記文献1には、体積平均径が $6.5\mu\text{m}$ 、形状係数が1.07の実質的に球形の重合トナー(実施例3)を含有する非磁性一成分現像剤を、現像同時クリーニング方法に使用することが記載され、また、懸濁重合により粒径分布の狭いトナー粒子を得られることが記載されている。上記文献2, 3には、重合法により $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度の平均粒径で、 $3\mu\text{m}$ 以下、 $12\mu\text{m}$ 以上または $20\mu\text{m}$ 以上の粒子の含有量が少ないトナーを得られることが記載されており、文献1~3より、請求の範囲1-5, 11, 13, 14に記載された発明は進歩性を有しない。

請求の範囲6-9, 15-18

上記文献4には、体積平均径が $5\sim 10\mu\text{m}$ 、長径と短径との比が1~1.2のコア・シェル型重合トナーを含有する非磁性一成分現像剤において、コア用重合性単量体とシェル用重合性単量体との重量比率は $90/10\sim 99.5/0.5$ がより好ましいこと、重合トナーは粒径分布がシャープな球形の微粒子であること、コア粒子を構成する重合体成分よりも高いガラス転移温度を有する重合体を形成し得る重合性単量体でシェルを形成することが記載されており、文献1~4より、請求の範囲6-9, 15-18に記載された発明は進歩性を有しない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

## 請求の範囲 10、19

上記文献5には、トナー粒子を形成する単量体と共重合可能な電荷制御性官能基含有水溶性単量体を用いることが記載され、この場合、形成される重合体は、重合性単量体に可溶性の帯電制御性樹脂と考えられる。また、上記文献6には、重合法により小粒子径のトナーを製造する際、重合性単量体中に分散する電荷制御剤として極性官能基を有する高分子化合物を使用することが記載されており、文献1～3、5、6より、請求の範囲10、19に記載の発明は進歩性を有しない。

## 請求の範囲 12

感光体と現像ローラの接触部における回転方向が同方向であることは文献2、文献7に記載され、文献7には、非磁性一成分トナーを用いる現像装置において潜像担持体とトナー担持体との周速比を1:1～1:5とすることが記載されているから、文献1～3、7より、請求の範囲12に記載された発明は進歩性を有しない。

特 許 協 力 条 約

PCT



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 G906-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04653	国際出願日 (日.月.年) 27.08.99	優先日 (日.月.年) 28.08.98
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12P 7/64 // (C12P 7/64, C12R 1:645)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12P 7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	LI, ZU-YI. et al. "Process for production of arachidonic acid concentrate by a strain of Mortierella alpina", Can. J. Chem. Eng. (1995) Vol. 73, No. 1, p. 135-139	11-12, 17-20 1-10, 13-16
X A	JP, 2-142486, A1 (ライオン株式会社) 31.5月.1990 (31.05.90) (ファミリーなし)	11-12, 17-20 1-10, 13-16
X A	TOTANI, N. et al. "Industrial production of arachidonic acid by Mortierella", Ind. Appl. Single Cell Oils (KYLE, D. J. edit. AOCS Champaign) (1992), p. 52-60	11-12, 17-20 1-10, 13-16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* ・・・引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO, 96/21037, A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.) 11. 7月. 1996 (11. 07. 96) & AU, 9648542, A & US, 5658767, A & EP, 800584, A1 & NO, 9703085, A & FI, 9702829, A & BR, 9607179, A & MX, 9705078, A1 & JP, 10-512444, W & KR, 98701036, A	<u>17-19</u> 1-16, 20
<u>P, X</u> P, A	WO, 98/39468, A1 (サントリー株式会社) 11. 9月. 1998 (11. 09. 98)	<u>17-18</u> 1-16, 19-20
<u>P, X</u> P, A	SHIMADA, Y. et al. "Enzymatic enrichment of arachidonic acid from Mortierella single-cell oil", J. Am. Oil Chem. Soc. (1998. Sep.) Vol. 75, No. 9, p. 1213-1217	<u>11-12, 17-20</u> 1-10, 13-16
<u>Y</u> A	SHIMADA, Y. et al. "Enrichment of arachidonic acid: selective hydrolysis of a single-cell oil from Mortierella with Candida cylindracea lipase", J. Am. Oil Chem. Soc. (1995) Vol. 72, No. 11, p. 1323-1327	<u>11-12, 17-20</u> 1-10, 13-16
A	LINDBERG, A. M. et al. "Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus Mortierella alpina CBS 343. 66 in fermenter cultures", Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) Vol. 39, No. 4-5, p. 450-455	1-20
A	JP, 8-214893 (OMEGATECH INC.) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A2 & AU, 9537991, A & CA, 2163278, A & US, 5583019, A & US, 5882703, A	1-20